

Benzoquinone에 의한 혈소판 응집 억제 및 세포독성

이선구 · 강규태 · 이무열 · 정승민 · 정진호*

서울대학교 약학대학

Effects of Benzoquinone on Aggregation and Cytotoxicity in Platelets

Sun-Ku Lee, Kyu-Tae Kang, Moo-Yeol Lee, Seung-Min Chung and Jin-Ho Chung*

Seoul National University, College of Pharmacy, Shinrim-dong San 56-1

Seoul 151-742 Korea

(Received November 17, 2000)

(Accepted December 12, 2000)

ABSTRACT : Previous studies showed that benzoquinone derivatives inhibited platelet aggregation, but there is no information available on their cytotoxicity to platelets. In the present study, washed platelets isolated from rats were treated with 1,4-benzoquinone, a representative benzoquinone derivative, to examine its antiaggregating effect and cytotoxicity. 1,4-Benzoquinone significantly inhibited thrombin-induced platelet aggregation. Consistent with this finding, 1,4-benzoquinone suppressed cytosolic calcium increase induced by thrombin. To examine the cytotoxicity by 1,4-benzoquinone in platelets, turbidometry and lactate dehydrogenase release were measured. Treatment with 1,4-benzoquinone resulted in slight cytotoxicity (30% release at 60 min) to platelets. However, the cytotoxicity was not correlated with increase of cytosolic calcium levels in platelets. All these data suggested that 1,4-benzoquinone inhibited thrombin-induced platelet aggregation mediated by inhibition of calcium level increase and that 1,4-benzoquinone reveals cytotoxicity to some extent without alteration of calcium level in platelets.

Key Words : Benzoquinone, Platelet aggregation, Cytotoxicity, Cytosolic calcium

I. 서 론

혈소판은 혈액 성분의 하나로 지혈(hemostasis) 및 혈전(thrombosis) 생성과 각종 혈관 질환 유발에 있어서 주된 역할을 담당하는 세포이다. 즉, 혈관이 물리적, 화학적 자극에 의해 손상을 받으면 혈소판이 활성화되어 혈소판 응집 및 혈관벽 부착(Stormorken, 1984)을 일으켜 혈관벽을 재생시키거나 혈전을 생성시킨다. 혈소판 응집 정도는 정상 상태에선 NO나 PGE₂ 등의 내인성 응집억제 인자에 의해 조절되고 있지만 병적 소인이나 화학 물질에 의해 이러한 균형이 깨질 경우 혈전의 과도 생성으로 인해 동맥 경화등의 심혈관 질환의 주요 원인으로 작용될 수 있다.

따라서 지나친 혈소판 응집을 억제함으로써 혈관질환을 예방하고자 많은 연구가 보고 되었다. Adenosine receptor를 차단하는 adenosine 유도체(Vittori 등, 1996), cGMP를

증가시키는 furoxan 유도체(Civelli 등, 1994)와 NO donor (Bassenge & Stewart, 1988), thromboxane 합성 억제제 (Verstraete 등, 1995), prostacyclin 유도체(Katsube 등, 1993) 등이 혈소판 응집을 억제한다고 보고되었다.

Quinone계 물질들은 환경내에 널리 존재하는 물질로 동물, 식물, bacteria, fungi 내에 존재하여 세포 내 호흡이나 광합성 등에 관계된 전자 전달계의 구성 성분으로 작용하며 인간에게 음식과 대기내 오염 물질로써 흔히 노출된다 (Monks 등, 1992). 이러한 quinone계 물질은 항암제, 항류마티스제, multi-vitamin 제로도 사용되고, 그 외 항염증 작용, 항알러지 작용(Lien 등, 1996) 등이 있으며, 최근에는 혈소판에서의 항응집 작용을 이용해서 항혈전제로의 개발이 시도되어지고 있다. 현재까지 보고된 혈소판에서 항응집 작용을 보이는 naphthoquinone계 물질에는 phosphoinositide의 분해를 막음으로써 토끼 혈소판의 응집작용을 강하게 억제하는 2-chloro-3-methyl-1,4-naphthoquinone (Ko 등, 1990), 사람의 혈소판에서 intracellular Ca²⁺의 이동을 방해하여 항응집 현상을 보이는 menadione 및 vit-

*To whom correspondence should be addressed

amin K 유도체(Blackwell 등, 1985), 이외에도 thromboxane A₂ synthase를 억제하여 혈소판 응집을 막는 NQ-Y15 (Chang 등, 1997) 등이 보고되었다. 그러나 benzoquinone 계열 물질로써는 2-methoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone (Lauer 등, 1991), arylmethyl-1,4-benzoquinones(Suzuki 등, 1997) 등이 혈소판 항응집 작용을 갖는다고 알려져 있으나 작용기전에 관하여는 연구된 바가 없다. 또한 benzoquinone은 다른 quinone 계열에서 유발되는 oxidative stress와는 달리 arylation에 의하여 세포독성이 일어나기 때문에(Seung 등, 1998) 저농도에서도 세포독성을 일으킬수 있다.

본 연구에서는 quinone계 물질인 1,4-benzoquinone을 선택하여 혈소판 응집 억제 작용은 혈소판 활성화시의 calcium 억제와 관련이 있음을 확인함과 동시에 benzoquinone의 혈소판내의 세포독성 정도를 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

Sprague-Dawley 암컷 흰쥐를 서울대학교 동물사육장으로 부터 공급받아, 4주 이상 물과 사료(삼양사, Korea)의 제한없이 사육하였으며, 체중 200±20 g이 되는 것을 실험에 사용하였다. 사육시 밤과 낮의 주기가 각각 12시간씩 되도록 하였다.

2. Washed Platelets 분리

흰쥐를 diethylether로 마취후 개복하여 복대동맥으로부터 채혈하였다. 이 때 항응고제로는 acid-citrate-dextrose (85 mM trisodium citrate, 71 mM citric acid, 111 mM dextrose)를 1:6의 비율로 사용하였고 용혈에 의한 혈소판 활성화를 방지하기 위하여 18 gauge needle이 달린 주사기로 채혈하였다. 채혈액을 150 g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취하고, 이를 500 g에서 10분간 원심분리하여 pellet을 얻은 후, washing buffer(138 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 0.8 mM KH₂PO₄, 0.8 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 5.6 mM dextrose, 10% acid-citrate-dextrose, 0.35% BSA, pH 7.4)를 가해 세척하고 이를 다시 500 g에서 10분간 원심분리 하였다. 여기에서 얻은 혈소판 pellet을 HEPES-Tyrode's suspension buffer(138 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 0.8 mM KH₂PO₄, 0.8 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 5.6 mM dextrose, pH 7.4)로 재현탁 시켰다. 이와 같이 준비한 washed platelets(WP) 중의 혈소판 수는 광학현미경 상에서 hemacytometer를 이용하여 측정하였으며, 3×10⁸ cells/ml이 되도록 하였다. 여기에 CaCl₂를 가해 최종 농도가 1 mM이 되게 한후 실험에 사용하였다.

3. 혈소판 응집실험

Turbidometric method에 의하여 lumi-aggregometer (Chronolog corp. Harvertown, USA)를 이용하여 측정하였다. Suspension buffer에 의한 흡광도를 100%로, WP의 흡광도를 0%로 설정한 후, 혈소판 응집에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다. 이 때 WP는 silicon coating된 cuvette에 넣고 37°C에서 1200 rpm에서 지속적으로 교반하면서 1분간 안정화 시킨 후 thrombin(0.08~0.1 U/ml)을 가하여 응집을 유도하였고 3분 동안 관찰하였다. Benzoquinone을 전처리 하여 응집억제현상을 관찰하고자 하는 경우에는 WP를 1분간 안정화하고 benzoquinone을 5분간 incubation한 후 thrombin(0.1 U/ml)을 가하였다. Benzoquinone의 vehicle로는 DMSO 0.5%를 사용하였는데, 이 농도에서는 혈소판의 응집 및 세포독성에 영향을 미치지 않았다.

4. 혈소판내 [Ca²⁺]_i 측정

형광 dye가 loading된 혈소판을 조제하기 위하여 calcium green-1/AM에 anhydrous DMSO를 가해 3 mM로 만들었다. Dye 용액과 20% Pluronic F-127을 loading buffer(137 mM NaCl, 27 mM KCl, 0.4 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES, 12 mM NaHCO₃, 5.5 mM dextrose, 0.35% BSA)에 가해서 dye의 최종농도를 calcium green-1/AM은 3 μM으로, pluronic F-127은 0.02%, DMSO는 0.2%로 맞추었다. 형광 dye의 AM 형태는 지용성이므로 세포막을 투과한다. 그후 세포 내의 esterase에 의해 분해되면 세포내에 포획된다. Calcium green-1/AM을 세포내로 loading시키기 위해 다음과 같이 조작하였다. Washing buffer에 현탁시킨 흰쥐 혈소판을 500 g에서 10분간 원심분리 하여 얻은 혈소판 pellet에 형광 dye가 함유된 loading buffer를 가해 현탁시킨 후 37°C에서 calcium green-1/AM의 경우는 1시간 동안 incubation 하였다. Incubation이 끝난 후 WP를 다시 500 g에서 10분간 원심분리 한 후, 가라앉은 pellet에 HEPES-Tyrode's buffer를 가해 현탁하고 광학현미경 상에서 hemacytometer를 이용하여 측정하여 세포수를 3×10⁸ cells/ml로 맞추었다. Autofluorescence 측정을 위해 형광 dye에 노출되는 것을 제외하고 나머지 조작을 동일하게 한 WP를 함께 조제한 후 세포내 calcium 농도를 측정하였다.

Spectrofluorimeter의 EX를 506 nm, EM을 533 nm으로 고정시킨 후 calcium green-1이 loading된 WP를 넣고 37°C에서 교반하면서 1분간 preincubation한후 각 농도의 menadione 또는 DMSO를 넣고 5분간 반응시켰다. 여기에 thrombin(0.1 U/ml)을 가하여 증가되는 fluorescence intensity를 3분간 측정하였다. 세포내 calcium 농도계산을 위한 calibration은 calcium 1 mM이 함유된 WP에 EGTA 4

mM 및 Tris 30 μ M를 투여하여 외부 calcium을 chelation 시킨 후, digitonin(50 μ g/m)을 가해 감소한 fluorescence intensity를 F_{min} 으로 하고 여기에 $CaCl_2$ (4 mM)를 가하여 증가된 fluorescence intensity를 F_{max} 로 읽었다. 이 값을 아래식에 대입하여 calcium 농도로 환산하였다.

$$[Ca^{2+}]_i = K_d (F - F_{min}) / (F_{max} - F), K_d = 190 \text{ nM}$$

5. Lactate Dehydrogenase 유출실험

혈소판으로부터 lactate dehydrogenase(LDH) 유출은 spectrophotometry 방법을 사용하였다. 37°C로 가온한 Tris-EDTA-NADH buffer(pH 7.4) 1.0 ml에 0.025 ml의 원심분리한 WP의 상층액을 가한후 37°C에서 10분간 incubation 하였다. 여기에 37°C에서 미리 가온한 14 mM pyruvate를 0.1 ml 가하고 339 nm에서의 흡광도 감소를 측정했다. 흡광도 감소속도는 NADH의 산화속도를 의미하며 이를 혈소판으로부터 유리된 LDH의 활성도로 나타냈다.

6. 통계

Turbidity data는 3회 이상 실험하여 동일한 경향이 나오는 것을 확인하고 그 중 대표적인 그림을 data로 실었다. 다른 data는 3회 이상 실험한 후 그 값을 $means \pm SEM$ 으로 표시하였다. 각군간의 차이는 one-way ANOVA test를 수행한 후 Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성을 검증하였다. 별도로 기술하지 않는 한 $p < 0.05$ 인 경우 유의성 있는 것으로 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

흰쥐로부터 혈소판 washed platelets(WP)를 분리한 후 agonist인 thrombin을 사용하여 혈소판 응집을 활성화시켰다. 1,4-benzoquinone을 5분 전처리한 결과 1,4-benzoquinone은 농도 의존적으로 혈소판 응집을 억제함을 보여주고 있다(Fig. 1). 혈소판 응집과정에서 intracellular calcium의 역할은 매우 중요하다고 알려져 있기 때문에 calcium green-1 dye를 사용하여 혈소판 활성화시에 intracellular calcium 변화를 확인하였다. Thrombin을 가하면 intracellular calcium 농도가 급격히 증가함을 보여주고 있는데 이러한 증가는 1,4-benzoquinone 전처리에 의하여 농도 의존적으로 감소함을 보여주고 있다(Fig. 2). 이 결과는 1,4-benzoquinone에 의한 혈소판 응집 억제 양상과 동일함을 보여주고 있으며 1,4-benzoquinone 혈소판 응집 억제 작용기전은 intracellular calcium 증가 억제로 설명할 수 있음을 제시하고 있다.

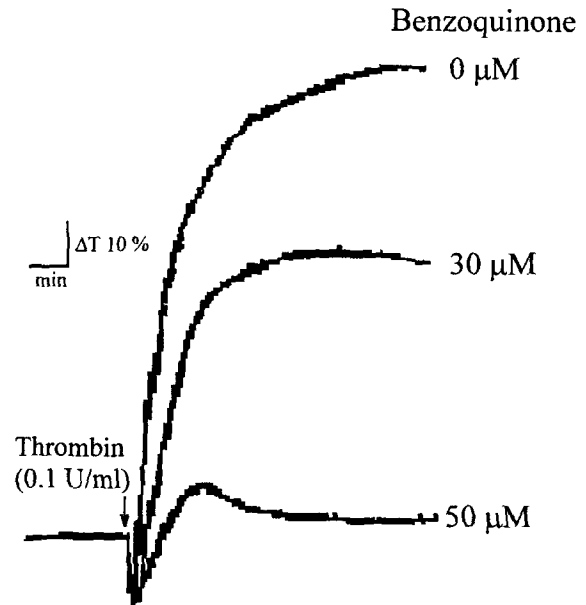


Fig. 1. Effect of 1,4-benzoquinone on platelet aggregation induced by thrombin. Rat washed platelets were incubated with various concentrations of 1,4-benzoquinone or DMSO (control) at 37°C. Platelet aggregation was measured using a lumi-aggregometer following addition of thrombin (0.1 U/ml). Arrow indicates the time of thrombin addition. Figure is representative of three experiments.

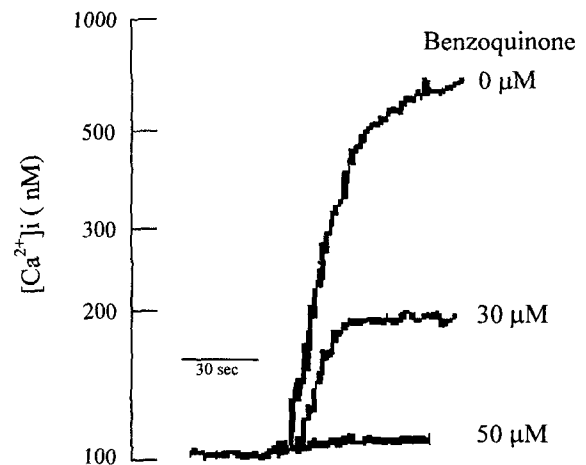


Fig. 2. Effect of 1,4-benzoquinone on cytosolic calcium levels induced by thrombin. Calcium green-1 loaded platelets in a fluorimeter cuvette were preincubated for 1 min and then pretreated with various concentrations of 1,4-benzoquinone for additional 3 min. Platelet aggregation was induced by addition of thrombin (0.1 U/ml); fluorescence was measured for 3 min at the excitation wavelength (506 nm) and the emission wavelength (533 nm). Calculation of cytosolic calcium levels was described under Materials and Methods. Figure is representative of three experiments.

Quinone 계열 중에서 benzoquinone은 일반적으로 혈소판에 세포독성이 강한 것으로 보고(Seung 등, 1998)되고 있기 때문에 1,4-benzoquinone이 혈소판 응집억제를 일으키는 IC_{50} 근처의 농도 25 μ M을 선정하여 혈소판의 세포

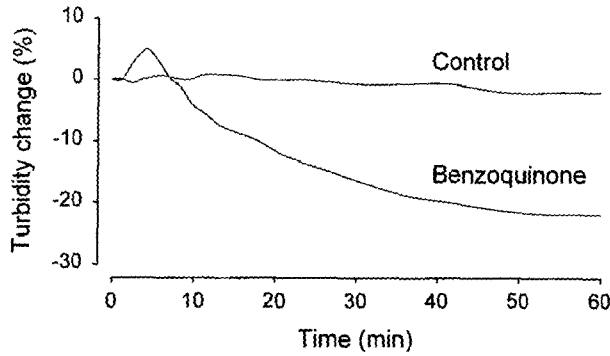


Fig. 3. Turbidity change of rat platelet induced by 1,4-benzoquinone. Rat washed platelets were incubated with 1,4-benzoquinone (25 μ M) or DMSO (control) at 37°C for 1 hr and turbidity change was measured using aggregometer. Figure is representative of three experiments.

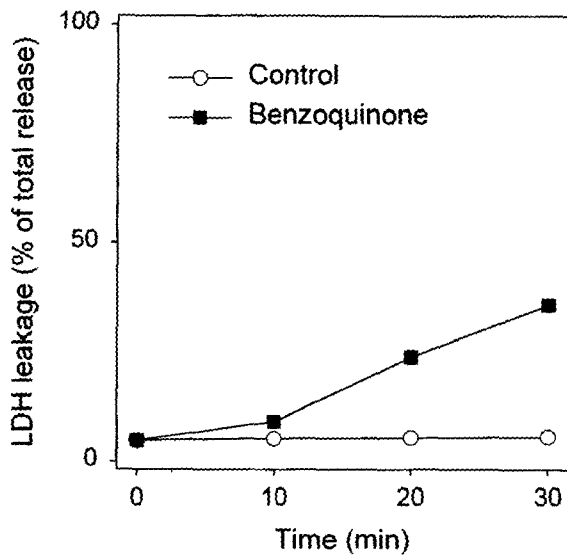


Fig. 4. Time dependence of cytotoxicity in rat platelets induced by 1,4-benzoquinone. Washed platelets were incubated with 1,4-benzoquinone (25 μ M) or DMSO (control) at 37°C. LDH leakage was measured as described in materials and methods. Values are means \pm SEM (n = 3).

독성을 연구하였다. 우선 platelet aggregometer상의 turbidity 변화를 관찰하였다(Fig. 3). 초반 10분 이내의 turbidity 증가하는 것은 혈소판의 shape change라고 사료되며 30분 동안 turbidity의 감소(세포독성 지표)가 관찰되었다. 세포독성의 직접적인 지표로서 LDH release를 측정할 결과 25 μ M 1,4-benzoquinone을 처리한 경우 LDH release가 30분 동안 30%의 release를 보임으로써 turbidity 결과와 유사한 점을 보이고 있다. Quinone 계열의 세포 독성은 intracellular calcium 증가와 관련있음이 보고(Nicotera 등, 1989)되고 있기 때문에 1,4-benzoquinone 처리 후 세포내 calcium이 증가하는지를 관찰하였다(Fig. 5). 1,4-benzoquinone은 25 μ M의 농도에서 intracellular calcium

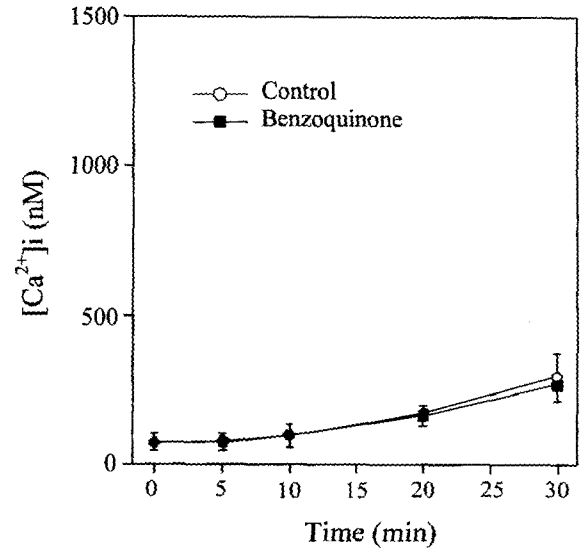


Fig. 5. Effect of 1,4-benzoquinone on cytosolic calcium levels in platelets. To measure effect of 1,4-benzoquinone on cytosolic calcium levels, calcium green-1 loaded platelets in a fluorimeter cuvette were pretreated with 1,4-benzoquinone or DMSO vehicle control for 5 min. Fluorescence was measured for 3 min at the excitation wavelength (506 nm) and the emission wavelength (533 nm). Calculation of cytosolic calcium levels was described under Materials and Methods. Values are means \pm SEM (n = 3).

증가를 전혀 유발하지 않았다.

본 연구에서 1,4-benzoquinone은 agonist인 thrombin에 의한 intracellular calcium 증가는 농도 의존적으로 억제시키지만(Fig. 2), 1,4-benzoquinone 자체는 intracellular calcium을 증가시키지 않음(Fig. 5)을 알 수 있다. 혈소판은 intracellular calcium의 변화에 따라 다음과 같은 상반된 효과를 갖는다. 즉 agonist 자극을 통한 혈소판 응집에 따른 intracellular calcium 증가는 1,4-benzoquinone이 억제할 수 있지만 1,4-benzoquinone 자체는 혈소판 calcium 증가와 관련된 machinery 차단에 의하여 calcium level에 변화를 일으키지 않는다. 한편 독성발현에 미치는 calcium의 역할은 세포내 calcium의 증가가 세포독성에 관여한다는 보고는 매우 많으며 calcium의 증가가 세포독성의 final common pathway이며 bleb 형성 및 rupture에도 매우 중요하다고 하였다(Thor 등, 1982; Di Monte 등, 1984). 본 연구에서 25 μ M 1,4-benzoquinone은 30분까지 약간의 세포 독성을 유발하지만 세포내 calcium 변화는 유발하지 않기 때문에 세포독성의 초기 단계(LDH release 30% 미만)에서는 세포내 calcium 변화가 일어나지 않음을 알 수 있다.

세포내 calcium 변화측정은 형광 dye를 이용하여 하는데 가장 큰 단점으로는 처리한 quinone 화합물질에 의하여 dye의 excitation과 emission에 영향을 미치는 quenching effect이다. 1,4-Benzoquinone은 400 nm까지 absorption이

있기 때문에 일반적으로 사용되는 fura-2 대신에 calcium green-1을 이용하여 calcium 변화를 측정했다. Calcium green-1은 visible 영역에서 excitation과 emission되는 형광 dye로 혈소판에서의 calcium 농도변화를 측정할 수 있었으며 또한 thrombin에 의한 calcium 증가도 Fura-2로 측정시와 유사한 결과를 보이고 있었다(Lee 등, 1999).

본 연구에서 1,4-benzoquinone의 세포독성을 연구하기 위하여 사용한 농도는 25 μ M로써 혈소판 응집을 억제시키는 IC₅₀ 근처의 농도를 사용하였다. 과거에 혈소판 응집 억제 작용이 보고된 2-methoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone, arylmethyl-1,4-benzoquinones 등은 IC₅₀이 5 μ M 미만(Lauer 등, 1991; Suzuki 등, 1997)이지만 일반적으로 benzoquinone은 다른 quinone에 비하여 arylation을 통하여 강한 세포독성을 매개하기 때문에, 25 μ M에서 약간의 세포 독성이 관찰되기 때문에 benzoquinone 유도체를 혈소판 응집 억제제로써 개발하기에는 독성의 문제를 신중히 검토하여야 할 것이다.

참고문헌

- Bassenge, E. and Stewart, D.J. (1988): Interdependence of pharmacologically-induced and endothelium-mediated coronary vasodilation in antianginal therapy. *Cardiovasc. Drugs. Ther.*, **2**, 27-34.
- Blackwell, G.J., Radomski, M. and Moncada, S. (1985): Inhibition of human platelet aggregation by vitamin K. *Thromb. Res.*, **37**, 103-114.
- Chang, T.S., Kim, H.M., Lee, K.S., Khil, L.Y., Mar, W.C., Ryu, C.K. and Moon, C.K. (1997): Thromboxane A₂ synthase inhibition and thromboxane A₂ receptor blockade by 2-[(4-cyanophenyl)-amino]-3-chloro-1,4-naphthoquinone (NQ-Y15) in rat platelets. *Biochem. Pharmacol.*, **54**, 259-268.
- Civelli, M., Caruso, P., Giossi, M., Bergmaschi, M., Razzetti, R., Bongrani, S. and Gasco, A. (1994): CHF 2206, a new potent vasodilating and antiaggregating drug as potential nitric oxide donor. *Eur. J. Pharmacol.*, **255**, 17-24.
- Di Monte, D., Bellomo, G., Thor, H., Nicotera, P. and Orrenius, S. (1984): Menadione-induced cytotoxicity is associated with protein thiol oxidation and alteration in intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**, 43-350.
- Katsube, N., Sakaguchi, K., Fujitani, B. and Aishita, H. (1993): Anti-platelet and anti-thrombotic effects of OP-41483, alpha-CD, a prostacyclin analogue, in experimental animals. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.*, **49**, 795-804.
- Ko, F.N., Sheu, S.J., Liu, Y.M., Huang, T.F. and Teng, C.M. (1990): Inhibition of rabbit platelet aggregation by 1,4-naphthoquinone. *Thromb. Res.*, **57**, 453-463.
- Lauer, U. and Anke, T. (1991): 2-Methoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone, a thromboxane A₂ receptor antagonist. *J. Antibiotics.*, **44**, 59-65.
- Lee, S.K., Lee, J.Y., Lee, M.Y., Chung, S.M. and Chung, J.H. (1999): Advantages of calcium green-1 over other fluorescent dyes in measuring cytosolic calcium in platelets. *Anal. Biochem.*, **273**, 186-191.
- Lien, J.C., Huang, L.J., Wang, J.P., Teng, C.M., Arese, P., Lee, K.H. and Kuo, S.C. (1996): Synthesis and antiplatelet, antiinflammatory and antiallergic activities of 2,3-disubstituted 1,4-naphthoquinones. *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1181-1187.
- Monks, T.J., Hanzlik, R.P., Cohen, G.M., Ross, D. and Graham, D.G. (1992): Contemporary issues in toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **112**, 2-16.
- Nicotera, P., Rundgren, M., Porubek, D.J., Cotgreave, I., Moldeus, P., Orrenius, S. and Nelson, S.D. (1989): On the role of Ca²⁺ in the toxicity of alkylating and oxidizing quinone imines in isolated hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.*, **2**, 46-50.
- Seung, S.A., Lee, J.Y., Lee, M.Y., Park, J.S., Chung, J.H. (1998): The relative importance of oxidative stress versus arylation in the mechanism of quinone-induced cytotoxicity to platelets. *Chem. Biol. Interact.*, **113**, 133-144.
- Stormorken, H. (1984): Platelets in hemostasis and thrombosis. In platelet responses and metabolism. ed. by H. Holmsen, CRC Press, Boca Raton, FL, 3-32.
- Suzuki, K., Tatsuoka, T., Ishihara, T., Ogino, R., Miyazaki, T., Satoh, F., Miyano, S. and Sumoto, K. (1997): 2-Arylmethyl-1,4-benzoquinones. II. Novel inhibitors of platelet aggregation: Synthesis and pharmacological evaluation. *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 668-674.
- Thor, H., Smith, M.T., Hartzell, P., Bellomo, G., Jewell, S.A. and Orrenius, S. (1982): The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **257**, 12419-12425.
- Verstraete, M. (1995): New developments in antiplatelet and antithrombotic therapy. *Eur. Heart. J.*, **16 Suppl L**, 16-23.
- Vittori, S., Camaioni, E., Di Francesco, E., Volpini, R., Monopoli, A., Dionisotti, S., Ongini, E. and Cristalli, G. (1996): 2-Alkenyl and 2-alkyl derivatives of adenosine and adenosine-5'-N-ethyluronamide : Different affinity and selectivity of E-and Z-diastereomers at A2A adenosine receptors. *J. Med. Chem.*, **39**, 4211-4217.